Der Einfluß von Inhibitoren der Protein- und Nukleinsäuresynthese auf die Vermehrung von Adenovirus Typ 19

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Ursula Josefa Schmieder-Matz

Saarbrücken
1973

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität des Saarlandes
Direktor: Prof. Dr.med.,Dr.phil. W. ZIMMERMANN

Der Einfluß von Inhibitoren der Protein- und Nukleinsäure-synthese auf die Vermehrung von Adenovirus Typ 19

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N
zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1972

vorgelegt von
Ursula Josefa Schmieder-Matz
geb. am 19.3.1945 in Dijon (Frankreich)

Dekan: Prof. Dr.med. H.KULENKAMPFF
Referent: Prof. Dr.med. R. WIGAND

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 13. Juni 1973 abgelegt.

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL UND METHODEN	5
1. Gewebekulturen	5
2. Virus	5
3. Hemmversuche	6
4. Austestung	8
5. Inhibitoren	13
III. ERGEBNISSE	17
1. Konzentrationsversuche	17
2. Verlauf der Virusvermehrung	22
3. Zeitversuche	24
4. Reversionsversuche	29
5. "Hungerversuche"	31
IV. DISKUSSION	32
V. ZUSAMMENFASSUNG	45
VI. LITERATURVERZEICHNIS	46

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41542725_0066

I. EINLEITUNG

Die Bekämpfung von Viruserkrankungen muß im wesentlichen noch immer auf die aktive Immunisierung und die Gabe von γ-Globulinen beschränkt bleiben. Die Bemühungen, diese Methoden durch die weniger aufwendige Behandlung mit Chemotherapeutika zu ersetzen, sind bisher daran gescheitert, daß sich die therapeutische Breite der in vitro oft gut wirksamen Substanzen als zu gering erwies.

Das Problem der toxischen Wirkung auf den Organismus ergibt sich daraus, daß die Virusreplikation unmittelbar von den biochemischen Vorgängen in der Wirtszelle abhängig ist. Medikamente, die z.B. die Nukleinsäuresynthese von Viren hemmen, beeinträchtigen in gleicher Weise die Nukleinsäuresynthese der Wirtszelle, wenn sie in therapeutisch wirksamer Dosis verabreicht werden. Eine weitere Schwierigkeit liegt darin, daß der Ablauf der Virusvermehrung innerhalb von wenigen Stunden erfolgt. Dadurch ist schon bald nach der Infektion, oft bevor überhaupt Symptome auftreten, eine destruierende Wirkung auf die Wirtszelle vorhanden. Es ist also nahezu unmöglich, eine Virusinfektion im Anfangsstadium zu behandeln. Ein wirksames Therapeutikum sollte die vitalen Vorgänge der Wirtszelle weniger beeinträchtigen als die der Virusvermehrung. Ein Weg zur Auffindung eines solchen besteht darin, die Virusrepli-

kation unter dem Einfluß von verschiedenen Hemmstoffen zu erforschen, um bisher unbekannte Virusspezifische biochemische Prozesse zu finden, die sich von denen der Wirtszelle unterscheiden.

Über den Ablauf der Vermehrung von Adenoviren existieren heute folgende molekularbiologische Modellvorstellungen: Nach der Infektion einer Zellkultur kommt es zunächst zu einer Adsorption des Virus an die Wirtszelle. Dieser Mechanismus ist bis heute noch nicht geklärt; man schreibt dem aus Protein bestehenden Kapsid eine gewisse Bedeutung zu. Innerhalb von 2 Std. erfolgt nun die Penetration in die Zelle, in der das sog. Decoating abläuft. Dabei wird der Proteinmantel des Virus abgebaut, so daß die Virus-DNS freigesetzt wird. An dieser DNS, die in 2 Doppelstränge zerfällt, bildet sich ca. 3 h p i eine frühe m-RNS, die zur Produktion von Früh- oder Enzymproteinen benötigt wird. Nach POLASA und GREEN (14) beginnt diese Enzymproteinsynthese bei Adenovirus 2 etwa 4 h p i . 2 bis 3 Stunden danach, d.h. 7 h p i ist der Stoffwechsel der Wirtszelle mit Hilfe der Enzyme so umprogrammiert, daß die biochemischen Prozesse in Richtung Virus-DNS laufen. Den weiteren Vermehrungsablauf stellt man sich so vor, daß es über eine späte m-RNS schließlich zur Bildung von Spät- oder Virusstrukturproteinen kommt, die nach Polasa und Green 10 h p i nachzuweisen sind. Der Vor-

gang der Virusreifung, d.h. der Zusammenfügung von Virus-DNS und Virusstrukturprotein zu einer neuen Viruseinheit soll 3 Std. später, d.h. 13 h p i erfolgen.

Von den in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Inhibitoren der Protein- bzw. Nukleinsäuresynthese wurden einige in günstig gelagerten Fällen bei Menschen therapeutisch eingesetzt, insbesondere bei Infektionen mit Herpes simplex. Im übrigen haben diese Substanzen vorerst ihre wesentliche Bedeutung dadurch, daß es mit ihrer Hilfe gelingt, die biochemischen Vorgänge in der virusinfizierten Zelle besser zu verstehen. So hat man einzelne Substanzen schon früher mit Adenoviren der Typen 2, 4, 5, 7, 8 und 12 untersucht.

Fragestellung der Arbeit

Uns war daran gelegen,den Einfluß verschiedener Inhibitoren auf die Replikation von Adenovirus 19, einem Vertreter der bisher kaum untersuchten Untergruppe II, in HeLa-Zellkulturen zu untersuchen. Kriterien der Virushemmung waren:

a. der cytopathische Effekt (CPE),
b. die Neubildung von infektiösem Virus,
c. die Bildung von virusspezifischem Hämagglutinin (= Dodecon) (6)

d. die Bildung von gruppenspezifischem komplementbindendem Antigen (= Hexon) (6)

e. die Bildung von indirekt wirksamem Hämagglutinin (= Fiber + Penton) (7)

Insbesondere galt es zu prüfen, ob die verschiedenen virusspezifischen Vorgänge gleichartig gehemmt werden oder ob eine selektive Hemmung bestimmter Prozesse zu verzeichnen ist. Des weiteren war von Interesse, bis zu welchem Zeitpunkt im Verlaufe des Infektionszyklus die Substanzen noch wirksam sind. Hieraus ergeben sich Aufschlüsse über den Ablauf der Virusreplikation und die hierfür notwendigen biochemischen Schritte.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Gewebekulturen:

Wir verwendeten 2 Zellstämme (HeLa - Saarbrücken und HeLa - Düsseldorf), die sich etwa gleich verhielten. Als Wachstumsmedium für die Zellen diente Eagles MEM mit 5 % Kälberserum, als Erhaltungsmedium Eagle mit 2 % Kälberserum (KS). Für die Versuche mit p-Fluorphenylalanin verwendeten wir phenylalaninfreies Medium. Die Erhaltung der Zellen wurde dadurch nicht beeinträchtigt. Eine Röhrchenkultur enthielt 500 000 bis 1 000 000 HeLa-Zellen.

2. Virus:

Wie schon erwähnt, wählten wir den Prototypstamm von Adenovirus 19 (587) aus der Gruppe II der Adenoviren. Vor der Verwendung einer neuen Viruscharge wurde mit Hilfe einer Verdünnungsreihe der Virustiter bestimmt. Dazu mußte das Ausgangsvirus zunächst in 2er-Stufen vorverdünnt werden, ausgehend von der Verdünnung 1:2, also 1:4, 1:8, 1:16 u.s.w. Aus den Verdünnungsröhrchen wurden dann 0,2 ml Virusmaterial in je 2 HeLa-Röhrchen mit 1 ml Eagle einpipettiert. Die Röhrchen wurden insgesamt 48 Std. inkubiert. Nach 24 und 48 Std. wurde der CPE des Virus mikroskopisch abgelesen. Die Verdünnung,bei der 24 h p i ein CPE von 2-3 erreicht wurde, haben wir als Verdünnung für das Virus in den

folgenden Versuchen gewählt. Dies entspricht einer Multiplizität von 0,5-1 ID 50 pro Zelle, wie wir durch Endverdünnung des Virus in menschlichen embryonalen Nierenzellen ermittelten.

3. Hemmversuche:

Die einzelnen Substanzen wurden in höherer Konzentration als benötigt abgewogen, in Hanks-Lösung gelöst und in Vorratsflaschen bei -20° C aufbewahrt. Schwierigkeiten beim Auflösen machte lediglich die Substanz Jod-Desoxyuridin (JUdR), die kristallisiert vorlag. Erst nach Zerreiben der Kristalle mit dem Glasstab und Erwärmung des Lösungsmittels konnte es zur Lösung gebracht werden (1). Der pH-Wert im Medium veränderte sich durch die Zugabe der Substanzen nicht wesentlich. Kurz vor Durchführung der Hemmversuche wurden die konzentrierten Stammlösungen aufgetaut und mit Hanks-Lösung auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

3.1. Die K o n z e n t r a t i o n v e r s u c h e führten wir folgendermaßen durch: Nach einer Virusadsorption von 2 Stunden Dauer wurden die HeLa-Röhrchen 2-3 mal mit Hanks gewaschen und erhielten 1 ml Erhaltungsmedium. Danach wurden 3 Röhrchen als 2 Std.-Viruskontrolle eingefroren. In die übrigen Röhrchen pipettierten wir 0,25 ml des gelösten Inhibitors in 5-facher Konzentration; an-

schließend bewahrten wir die Röhrchenkulturen für insgesamt 48 Std. im Brutschrank auf. Nach 18,24 und 48 Std. wurde der CPE mikroskopisch abgelesen.

Zur Erläuterung:

CPE 1 = 25 % der Zellen
2 = 50 %
3 = 75 %
4 = 100 %

durch die Virusvermehrung geschädigt.

Nach der letzten Ablesung des CPE wurden alle Röhrchen mit Inhibitor und 3 Viruskontrollen durch Einfrieren bei -20° C geerntet.

3.2. Z e i t v e r s u c h e

Vor Beginn der Zeitversuche stellten wir eine Vermehrungskurve des zur Verwendung kommenden Adenovirus Typ 19 in HeLa-Kulturen auf. Dabei wurde wie folgt vorgegangen: Eine Virusmenge von 0,4 ml in 5 %igem KS-haltigem Medium je Röhrchen ließen wir 2 Std. lang bei 37° C an HeLa-Zellen adsorbieren. Danach wurde der Überstand abgesaugt und die Kulturen zweimal mit je 2 ml Hanks-Lösung gewaschen. Nun gaben wir in jedes Röhrchen 1 ml Eagle 2 % als Erhaltungsmedium und inkubierten die infizierten HeLa-Kulturen weiter. In bestimmten Zeitabständen von 2, 12, 14, 16 ... 36, 48 Std. nach der Infektion ernteten wir die Röhr-

chen. Vor der Austestung des Materials wurden die Röhrchen 3 mal eingefroren und wieder aufgetaut.

Bei den Zeitversuchen wurde das Virus 2 Std. lang auf den HeLa-Zellkulturen belassen, danach die Kulturen gewaschen und mit Eagle-Medium versehen. Zu bestimmten Zeiten (z.B. 2, 8, 12, 16 Std. ...) wurden die gelösten Inhibitoren in 5-facher Konzentration zugegeben.Die Ernte der Röhrchen erfolgte nach 48 Std. durch Einfrieren. Mit Hilfe dieser Zeitversuche wollten wir den Zeitpunkt nach der Infektion feststellen,bis zu dem jeweils der Inhibitor eine virushemmende Wirkung entfalten konnte.

3.3. Die Reversionsversuche sind nichts anderes als unterbrochene Konzentrationsversuche. Es ging uns darum, nachzuprüfen, ob die einzelnen Hemmeffekte reversibel sind. Nach 24-stündigem Einwirken der Substanzen wurden die Kulturen 2-3 mal gewaschen und erhielten normales Erhaltungsmedium ohne Inhibitor für weitere 48 Std.

4. Austestung

Vor der Austestung dieser Versuche mußten die Test-Röhrchen 2-mal aufgetaut und wieder eingefroren werden. Damit erreichte man, daß die Zellen von der Röhrchen-

wand abgelöst wurden und das Virus freigaben. Ein Abzentrifugieren des Zelldetritus war nicht erforderlich.
Austestung:

4.1. Titration der Infektiosität:

Als Erstes bestimmten wir die noch vorhandene Infektiosität des Virus, das in den einzelnen Versuchen verwendet worden war. Entsprechend der erwarteten Virusmenge führten wir eine Titration des geernteten Virusmaterials in neuen HeLa-Zellen durch. Hier wurde der CPE nach 24, 48 und 72 Std. abgelesen. Zur Beurteilung des Infektiositätstiters wählten wir die 48-Std.-Viruskontrolle als Bezugspunkt.

4.2. Direkte Hämagglutination (HA):

Mit Hilfe dieser Reaktion wird bei Adenovirus 19 in erster Linie das lösliche Hämagglutinin, das auch als Dodecon bezeichnet wird (6), bestimmt. Man versteht darunter ein Konglomerat aus 12 kapsomerenartigen Untereinheiten mit 12 stabförmigen Fortsätzen, die als Pentons bezeichnet werden. Da Dodecon durch eine Hämagglutination mit Rattenblutkörperchen (RBK) nachweisbar ist, mußte zuerst Rattenblut gewonnen werden. Nach der transthorakalen Herzpunktion einer Ratte wurde dem Blut Na-Citrat zugesetzt, um eine Gerinnung zu unterbinden. Vor der Verwendung zentrifugierten wir das Blut 3 mal mit gepufferter NaCl-Lösung bei 2000 U/Min. Durch Verdünnung

der RBK mit gepufferter NaCl erhielten wir eine 2%ige Suspension, die mit 0,5 % inaktiviertem Kaninchenserum versetzt wurde.

Zur Durchführung der HA verwendeten wir Plexiglas-Platten mit runden Vertiefungen, in denen wir zuerst mit McIlvaine gepufferte 0,9 %ige NaCl-Lösung vorlegten. Man stellte eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2 her, so daß sich eine Virusverdünnung mit 1:4, 1:8, 1:16 usw. ergab. Man legte also in der 1. Vertiefung 0,6 ml und in allen weiteren 0,4 ml gepufferte NaCl-Lösung vor und gab dazu 0,2 ml Testmaterial, das auf Virus untersucht werden sollte. Dann wurden von der 1. Vertiefung ausgehend immer 0,4 ml verdünntes Material in die nächste Vertiefung überpipettiert. Abschließend mußte dann noch 0,2 ml Rattenblut eingetropft werden. Nach 60-90 min. Reaktionszeit bei Zimmertemperatur konnte man das Ergebnis ablesen. Die Beurteilung der Sedimentationsform wurde mit Hilfe von 5 Stufen von 0-4 durchgeführt. Stufe 0 bedeutet keine Agglutination; es ist also kein hämagglutinierendes Virusantigen nachweisbar. Stufe 4 bedeutet dementsprechend vollständige Agglutination durch das Virus. Als Endpunkt der Titration haben wir die Verdünnung mit der HA-Aktivität der Stufe 2 angesehen.

4.3 Indirekte Hämagglutination:

Als Vergleich zur direkten HA wurde einige Male die indirekte Hämagglutinationsreaktion durchgeführt. Sie

dient zum Nachweis der Viruskomponenten Penton- und Fiberantigen (7). Zu diesem Zweck mußten die Rattenblutkörperchen vor Gebrauch mit einem 1 %igen Immunserum eines heterologen Adenovirus anstelle von Kaninchennormalserum versetzt werden. Die Bestimmung der Titerhöhe von Penton und Fiberantigen wurde wie bei der direkten HA über eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2 durchgeführt.

4.4. Komplementbindungsreaktion (KBR):

Mit Hilfe dieser Reaktion wurden die komplementbindenden Antigene, die der Viruskomponente Hexon entsprechen, bestimmt (6). Hexon ist ein gruppenspezifisches Antigen; es besteht aus freien Kapsomeren, die einen Hohlraum besitzen. Die KBR wurde nach der Mikromethode durchgeführt, wie sie bei WIGAND (19) beschrieben ist. Hier sollen kurz die 3 wichtigsten Reaktionselemente der KBR erläutert werden:

a. Reaktion von Antigen und Antikörper
   Antigen ist hier das in den HeLa-Zellen gebildete Virus. Als Antikörper diente ein inaktiviertes antikörperhaltiges Menschenserum, das mit Veronalpuffer (VP) im Verhältnis 1:15 verdünnt wurde.

b. Reaktion mit dem Komplement
   Als Komplement verwendeten wir Meerschweinchennormalserum, das bis kurz vor Gebrauch bei -70° C eingefroren war. Das Komplement wurde zuerst mit VP

1:10 und 1:100 vorverdünnt und dann nach einer vorgegebenen Tabelle weiterverdünnt.

c. Reaktion mit dem hämolytischen System

Das hämolytische System besteht aus 10 %iger Hammelerythrozytensuspension, aus Ambozeptor (1:100 verdünnt) und aus Veronalpuffer. Das Hammelblut wurde vor Gebrauch 2-3 mal mit VP gewaschen und dann 1:10 verdünnt. Für unseren Bedarf genügten 20 ml hämolytisches System, das sich zusammensetzte aus:

1 ml HBK (10 %)
1 ml Ambozeptor (1:100)
18 ml VP

Das Gemisch wurde vor Gebrauch 10 Min. im Brutschrank erwärmt.

Zur praktischen Ausführung der KBR ist folgendes zu bemerken: Mit einer Tropfpipette wurden nacheinander je 1 Tropfen Antigen und Antikörper in die Vertiefungen der Plexiglasplatte gegeben. Dazu kamen die verschiedenen Komplementverdünnungen. Dieses Gemisch wurde 16 Std. im Kühlschrank bei + 4° C aufbewahrt. Dann wurde in jede Vertiefung 1 Tropfen hämolytisches System gegeben, und die Platten für 90 Min. in einen Brutschrank mit 37° C gestellt. Vor der Ablesung mußten die Platten leicht geschüttelt werden.

Als Antigentiter wählten wir die Antigenverdünnung, die

gerade noch 1 Einheit Komplement zu binden vermochte.

5. Inhibitoren (Herkunft siehe Tabelle I)

5.1. Cycloheximid (Actidion) und

5.2. Streptovitacin A (Strept A), ein 4-Hydroxyderivat von Cycloheximid.

Beide Substanzen sollen die Aminoacyl-transferase hemmen; es kommt also zur Hemmung des Translationsschrittes in der Proteinsynthese.

5.3. p-Fluorphenylalanin (FPA)

ist ein halogeniertes Derivat von Phenylalanin. Es wirkt als kompetitiver Hemmstoff, der das Phenylalanin bei der Proteinsynthese verdrängt.

5.4. Actinomycin D (Act D)

ist ein Antibiotikum aus Actinomyces Typ 2, das wahrscheinlich den Transskriptionsschritt der DNS hemmt. Nach Untersuchungen von KÖHLER u.ODAKA (12) reagiert es mit dem Guanin der Mutter-DNS. Es kommt also zu einer Hemmung der DNS-abh. RNS-Synthese.

5.5. Rifampicin (Rif)

findet als Tuberkulostatikum häufig Verwendung. Seine hemmende Wirkung beruht darauf, daß es mit der RNS-Polymerase einen stabilen Komplex bildet. Bei Viren ist der Wirkungsmechanismus möglicher-

weise anders. Bei Vaccinia wird der Vorgang der Virusreifung gehemmt; es häufen sich zahlreiche unreife nicht infektiöse Partikel in der Zelle (17).

5.6. Cytosin-Arabinosid (Ara C)

findet in der inneren Medizin als Cytostatikum Verwendung. Es ist dem Cytidin chemisch sehr ähnlich. Der Unterschied besteht darin, daß am C_2-Atom der Ribose die H- und OH-Gruppe vertauscht sind. Ara-C muß im Stoffwechsel zuerst zum Diphosphat phosphoryliert werden. Das Diphosphat hemmt die Reduktion von Cytidindiphosphat zur Desoxyverbindung. Das Triphosphat hemmt außerdem die DNS-Polymerase.

5.7. Jod-Desoxyuridin (JUdR)

wurde in der Augenklinik bereits als Virostatikum zur Behandlung von Herpeskeratitis und epidemischer Keratokonjunktivitis durch Adenotyp 8 mit unterschiedlichem Erfolg angewendet. Sein chemischer Aufbau gleicht weitgehend dem Thymidin; es enthält lediglich anstelle von einer CH_3-Gruppe ein Jod-Atom. Die Wirkung beruht darauf, daß in der DNS-Polynukleotidkette eine falsche Base eingebaut wird, die eine DNS-Replikation erschwert.

TABELLE I:

Inhibitoren der Protein-Synthese, der DNS-abhängigen RNS-Synthese und der DNS-Synthese

Substanzen, Toxizität für Zellkulturen, inhibierende Dosis

Substanz	Herkunft	Tox.Dosis (µg/ml)	Minimale Hemmkonz. (µg/ml)	Standard-Dosis (µg/ml)
Cycloheximid	Serva	25	5	10
Strept A	Upjohn	20	1	5
p-FPA	Calbiochem	500	100	
Actino-mycin D	Mann	0,2	0,1	0,4
Rifam-picin	Ciba	800	400	
Cytosin-arabinosid	Upjohn	500	1	5-10
5-Jod-2-Desoxy-uridin	Serva	1000	25*	25-250

*) bezüglich der Bildung von infektiösem Virus

5.8. Toxizität der Substanzen (siehe Tab. I)

Bevor die einzelnen Inhibitoren im Hemmversuch eingesetzt wurden, haben wir sie auf ihre zellschädigende Wirkung hin untersucht. Als toxische Dosis wurde die Konzentration des Hemmstoffes definiert, durch die nach 24 Std. ca. 50 % der HeLa-Zellen sichtbar verändert waren. Bei den Inhibitoren der Proteinsynthese lag die toxische Wirkung auf die

HeLa-Zellen in relativ niedrigen Konzentrationsbereichen. Bei Cycloheximid wirkten 25 µg/ml zytotoxisch; bei Strept A genügten bereits 20 µg/ml. Am stärksten machte sich die Toxizität von Act D bemerkbar. Diese Substanz zeigte bei einer Konzentration von 0,2 µg bereits nach 24stündiger Einwirkung kleine Rundzellen; nach 48 Stunden waren fast völlig zerstörte, zum größten Teil abgelöste Zellen zu sehen. Puromycin war mit 0,2 µg noch so stark toxisch, daß es für unsere Hemmversuche als nicht geeignet erschien. Bei FPA wurden erst ab 500 µg zytotoxische Erscheinungen beobachtet. Rifampicin wirkte bei 800 µg schädigend auf die HeLa-Zellen.

Ara C hatte bis 500 µg keine zellschädigenden Eigenschaften, es war also von diesem Gesichtspunkt aus als Virushemmstoff gut geeignet. Ebenso verhielt sich JUdR, bei dem man die Konzentration bis 1000 µg wählen konnte, ohne daß eine toxische Wirkung auf die Zellen festzustellen war.

III. ERGEBNISSE:

1. KONZENTRATIONSVERSUCHE:

Zunächst bestimmten wir die minimale Konzentration der Substanzen, die noch zu einer vollständigen Hemmung von Adenovirus 19 führte.

1.1. Cycloheximid (siehe Abb. 1)

Für diese Substanz ergab sich eine vollständige Hemmung der Neubildung aller Kapsidantigene bis zu 8 µg/ml. (Unter dem Begriff Kapsidantigene sind zu verstehen infektiöses Virusantigen, die direkten und indirekten Hämagglutinine sowie die komplementbindenden Antigene). Auch der zytopathische Effekt wurde durch Cycloheximid gehemmt. Bei 2 µg war keine sichere Hemmwirkung mehr vorhanden, d.h. verschiedene Versuche brachten einmal Hemmung, das andere Mal wieder keine Hemmung.

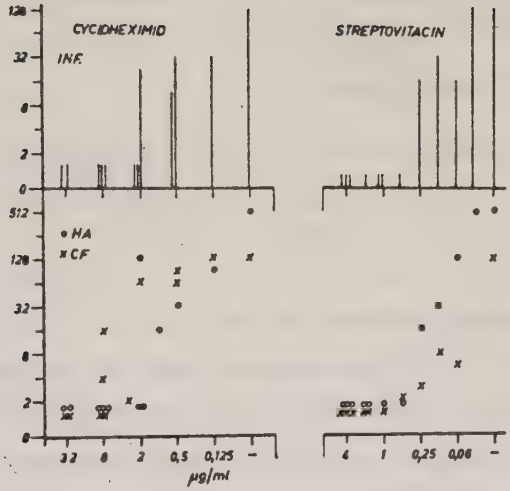

Abb. 1 und 2

Hemmwirkung von Cycloheximid und Streptovitacin auf die Kapsidantigene.

Inf. = Infektiöses Virusantigen

HA = Hämagglutinin

CF = Komplementbindendes Antigen (= complement fixing antigen)

1.2. Streptovitacin A (siehe Abb. 2)

Konzentrationen bis zu 1 µg bewirkten eine vollständige Hemmung der Synthese aller Kapsidantigene und des CPE. Mit 0,25 µg konnte nur noch eine partielle Hemmung erzielt werden.

1.3. Fluorphenylalanin

Orientierende Versuche mit dieser Substanz ergaben mit 100 µg eine vollständige Virushemmung; auch

bei 20 µg war noch eine deutliche Wirkung des Inhibitors festzustellen. Mit 4 µg FPA jedoch ließ sich eine Virusvermehrung nicht mehr verhindern.

1.4. Actinomycin D (siehe Abb. 3)

Von 0,4-0,1 µg zeigte sich eine vollständige Hemmung der Synthese der Kapsidantigene sowie des CPE. Ab 0,04 µg war das Virus bereits mit hohen Titern nachzuweisen. Auch der CPE trat wieder deutlich in Erscheinung.

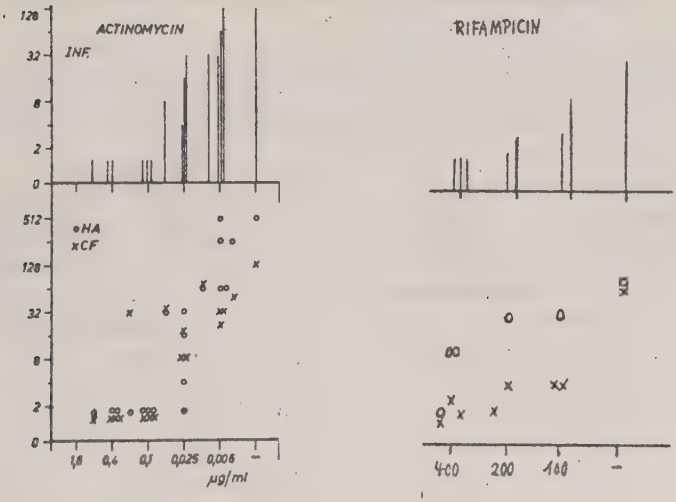

Abb. 3 und 4

Hemmwirkung von Actinomycin D und Rifampicin auf die Kapsidantigene.

1.5. Rifampicin (siehe Abb. 4)

brachte folgende Ergebnisse: 400 µg Rif hemmten die Neubildung aller Kapsidantigene vollständig; nicht gehemmt wurde der CPE. Mit 200 µg kam es noch zu einer partiellen Hemmung; ab 100 µg konnte die Virusvermehrung ungestört erfolgen.

1.6. Cytosin-Arabinosid (siehe Abb. 5)

Konzentrationen bis zu 1 µg ergaben eine gute Hemmung der Synthese aller Kapsidantigene. Der CPE hingegen blieb unbeeinflußt. Bei 0,5 µg war die hemmende Wirkung der Substanz nur noch gering.

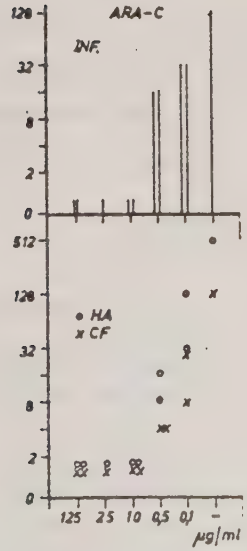

Abb. 5
Hemmwirkung von Cytosin-arabinosid (Ara-C)

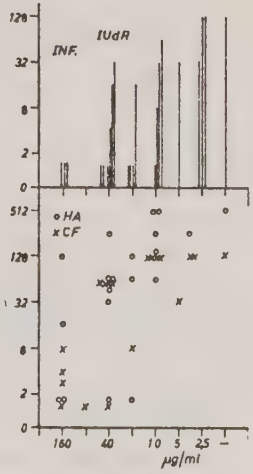

Abb.6
Hemmwirkung von Jod-Desoxy-uridin (IUdR)

1.7. Jod-Desoxyuridin (siehe Abb. 6)

Dieser DNS-Inhibitor zeigte eine Abweichung von den übrigen Substanzen, insbesondere von Ara C. Bis 50 µg war in der Regel eine vollständige Hemmung der Neubildung aller Kapsidantigene festzustellen. Ab 40 µg bis zu 10 µg kam es meist zu einer selektiven Hemmung der Synthese von infektiösem Virus. Die anderen Kapsidantigene dagegen waren bei 40 µg schon mit hohen Titerwerten vertreten. Unter 10 µg war keine Virushemmung mehr nachzuweisen.

Tabelle II:

Hemmwirkung der Inhibitoren bei maximal angewendeter Dosierung auf die Replikation von Adenovirus 19

Substanz	Konz. (µg/ml)	CPE	Infektiöses Virus	Kapsid-antigene
Cyclohex-imid	10	-	-	-
Strept A	5	-	-	-
p-FPA	100	-	-	-
Actino-mycin	0,4	-	-	-
Rifampicin	400	+	-	-
Ara-C	10	+	-	-
IUdR	25/50	+	-	+/-

2. VERLAUF DER VIRUSVERMEHRUNG (siehe Abb. 7 und 8)

Die Austestung der Virusreplikationsversuche zeigte ähnliche Ergebnisse, wie sie bei WIGAND u. WUNN (21) früher für diesen Virustyp beschrieben wurden. Wir führten diese Versuche mit zwei verschiedenen Virusmultiplizitäten durch. Virus A hatte eine 10 mal höhere Konzentration als Virus B. Der CPE lag für Virus A nach 14stündiger Inkubation bei Stufe 3-4, für Virus B nach 24stündiger Inkubation bei Stufe 2.

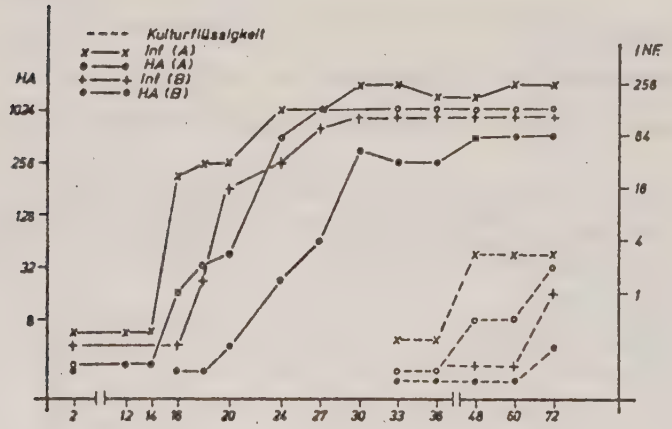

Abb. 7

Virusvermehrungskinetik

Bestimmung von infektiösem Virus (Inf.) und Hämagglutinin (HA)

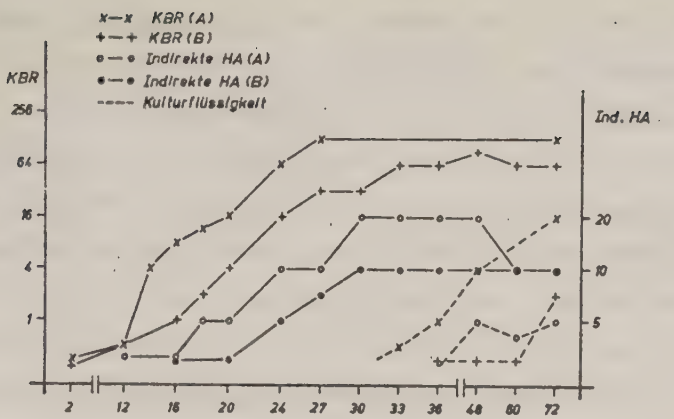

Abb. 8

Virusvermehrungskinetik

Bestimmung von komplementbindendem Antigen und indirektem Hämagglutinin

Da sich die Kurven für beide Viruskonzentrationen nur 2-4 Stunden unterscheiden, beschränken wir uns im folgenden auf die Beschreibung der Vermehrung von normal starkem Virus (Virus B). Am frühesten trat das komplementbindende Antigen in Erscheinung; es war bereits 16 h p i nachzuweisen. Das infektiöse Virus hatte eine Latenzzeit von 18 Std. Ähnlich verhielt sich das direkte Hämagglutinin, das 18-20 h p i auftrat. Das indirekte Hämagglutinin zeigte erst 20 h p i einen merklichen Titer. Nach diesen verschiedenen Latenzzeiten konnten wir einen starken nahezu logarithmischen Anstieg des Infektiositätstiters und aller Kapsidantigene verzeich-

nen. Nach 30 Std. war für alle Virusaktivitäten ein Plateau in der Vermehrungskurve erreicht. Wenn wir die Ergebnisse mit den früheren vergleichen (WIGAND u. WUNN (21)), stellen wir fest, daß bei uns die Latenzzeit und die Zeit bis zu Erreichung eines Vermehrungsplateaus um ca. 6 Std. früher liegt; d.h. daß in unseren Versuchen die Virusvermehrung schneller erfolgt ist. Die Empfindlichkeit der einzelnen Nachweismethoden stimmt jedoch bei beiden Untersuchungen in auffallender Weise überein.

3. ZEITVERSUCHE

3.1. Cycloheximid (siehe Abb. 9)

hemmte mit den auf der Abbildung angegebenen Konzentrationen bis zu 14 Stunden die Virusvermehrung vollständig. Bei 16 Std. war nicht immer eine Hemmwirkung vorhanden.

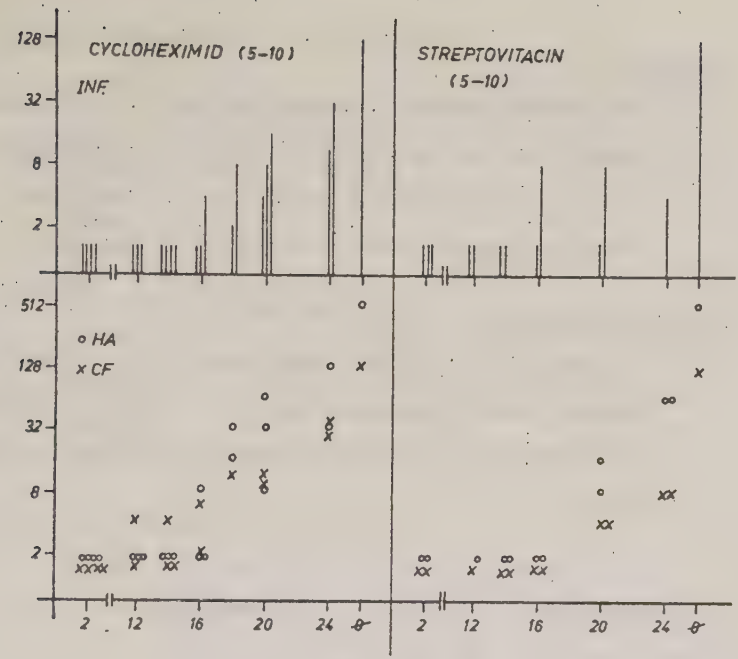

Abb. 9
Zeitliche Hemmwirkung von Cycloheximid

Abb. 10
Zeitliche Hemmwirkung von Streptovitacin A

3.2. Strept A (siehe Abb. 10)

zeigte bis 14 h p i eine vollständige Hemmung. Bei 16 Std. wurde das infektiöse Virus nicht mehr gehemmt, während Hämagglutinationsreaktion und KBR noch keinen Anstieg der Virustiter erbrachten. 20 h p i bewirkte die Substanz nur noch eine partielle Hemmung der Kapsidantigene.

3.3. FPA

Mit dieser Substanz führten wir nur einen Versuch durch, bei dem sich eine vollständige Hemmung bis 12 Std. einschließlich ergab. Bei 16 Std. war schon ein beachtlicher Virustiter vorhanden.

3.4. Actinomycin D (siehe Abb. 11)

brachte bis zu 12 Std. regelmäßig eine eindeutige Hemmung aller Kapsidantigene. Ab 14 Std. nach der Infektion war die Virusvermehrung nicht mehr aufzuhalten.

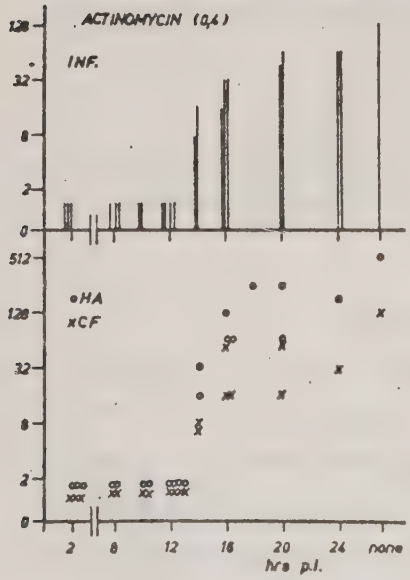

Abb. 11
Zeitliche Hemmwirkung von Actinomycin D

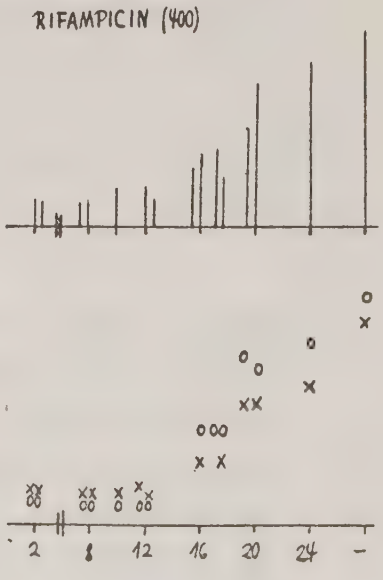

Abb. 12
Zeitliche Hemmwirkung von Rifampicin

3.5. Rifampicin (siehe Abb. 12)

hemmte ebenfalls 10-12 Std. vollständig. Bei 14 Std. war eine nur sehr schwache Hemmwirkung feststellbar, die bis 20 h p i noch weiter abnahm.

3.6. Ara C (siehe Abb. 13)

bewirkte eine vollständige Hemmung bis 10-12 h p i. Ab 14 Std. ließen sich alle Kapsidantigene nachweisen.

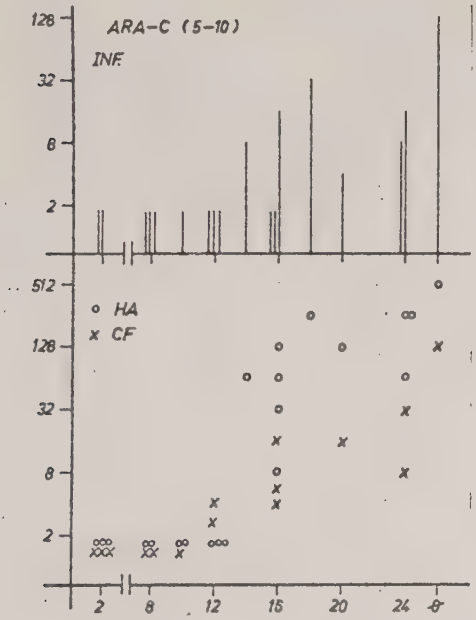

Abb. 13

Zeitliche Hemmwirkung von Cytosin-Arabinosid

3.7. IUdR (siehe Abb. 14)

zeigte, wie in den Konzentrationsversuchen, auch hier ein besonderes Verhalten. Es hemmte vorzugsweise bis 12 h p i die Bildung von infektiösem Virus; die Bildung der Kapsidantigene wurde nur partiell gehemmt. Nach 14 Std. stiegen die Titer an.

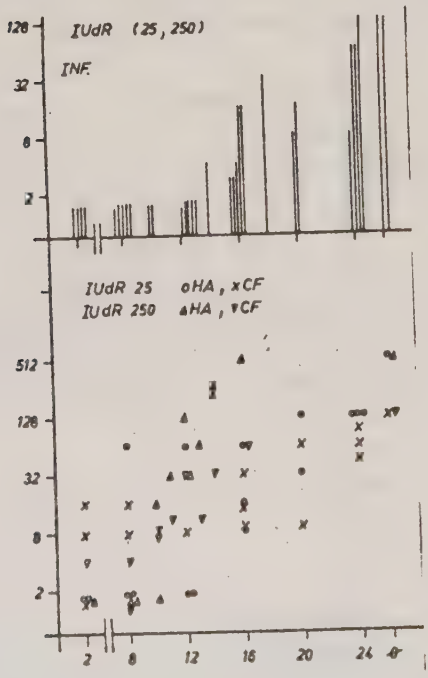

Abb. 14

Zeitliche Hemmwirkung von Jod-Desoxyuridin

4. REVERSIONSVERSUCHE

Bei Inhibitoren der Proteinsynthese tritt der CPE, der durch die Hemmwirkung der Substanzen 24 Std. unterdrückt wurde, nach ihrer Entfernung aus dem Medium wieder auf. Ebenso verhält es sich mit den einzelnen Viruskomponenten; nach Wegnahme des Hemmstoffes aus dem Medium werden nach einer weiteren Inkubation von 48 Std. alle Kapsidantigene mit im Vergleich zur Viruskontrolle etwas reduzierten Titern gebildet. (siehe Tab. III)

Ara-C zeigte nach der Entfernung der Substanz aus dem Medium eine nur geringe Reversion. IUdR, das ohne Mediumwechsel nur die Infektiosität vollständig hemmte, ermöglichte bei der Reversion nach 24 Std. eine normale Vermehrung aller Viruskomponenten. (siehe Tab. III)

TABELLE III:

Reversion der Hemmwirkung

Inhibitoren der Proteinsynthese und der DNS-Synthese

Substanz	Reversion	CPE	Inf.	HA	KBR
Cyclo-heximid (5 µg)	-	-	-	-	-
	+	+	16	64	5
	Virus-kontrolle		32	128	20
Strept A (5 µg)	-	-	-	-	-
	+	+	16	256	6
	Virus-kontrolle		64	1024	20
Ara-C (5 µg)	-	+	-	-	-
	+	+	8	128	20
	Virus-kontrolle		128	1024	160
IUdR (25 µg)	-	+	-	32	2
	+	+	64	1024	80
	Virus-kontrolle		64	1024	100

5. "HUNGERVERSUCHE"

Nach Ausführungen von FALKE u. RADA (2) wollten wir die Hemmwirkung der Substanzen untersuchen, nachdem wir die HeLa-Zellen zuvor ohne Nährmedium "hungern" ließen. Wir hielten dazu die Kulturen für 24 Std. in einem nährstoff- und vitaminfreien Medium, (Hanks-Lösung). Danach beimpften wir die Zellen mit Adenovirus 19, das wir 2 Std. lang adsorbieren ließen. Wir führten den Versuch nach der Virusadsorption mit normalem Eagle-Medium weiter, wie bei Methoden bereits beschrieben. Durch dieses Vorgehen sollte erreicht werden, daß der Pool an Nukleotiden und Aminosäuren in der Zelle aufgebraucht wird, so daß sie für die Virus-Synthese nicht mehr zur Verfügung stehen. Man erhoffte sich so unter besser definierten Bedingungen für die Virusvermehrung einen günstigeren Angriffspunkt für die Inhibitorsubstanzen. In unseren Hungerversuchen konnten wir jedoch keine stärkere Hemmwirkung der Substanzen feststellen als bei den Versuchen mit nährstoffreichem Medium. Insbesondere der CPE blieb erhalten. Auch die selektive Hemmwirkung von IUdR auf die Vermehrung von infektiösem Virus war weiterhin zu beobachten.

IV. DISKUSSION

1. Cycloheximid

FORD u. LEACH (4), die im Jahre 1947 die Substanz aus Streptomyces griseus-Stämmen isoliert haben, stellten eine gute Hemmwirkung auf Hefen fest. Es ist nahezu selbstverständlich, daß diese Substanz als Inhibitor der Protein-Synthese auch die Vermehrung von Viren hemmt, was bei verschiedenen Virusgruppen gefunden wurde. Die entsprechenden Versuche konnten jedoch nur in Zellkulturen durchgeführt werden, da eine in vivo-Anwendung wegen der starken Toxizität nicht möglich war. Es ist anzunehmen, daß dieser Effekt auf der universellen Hemmung aller Protein-Synthesen beruht. Aus unseren Zeitversuchen ergab sich mit 10 µg eine vollständige Hemmwirkung von Cycloheximid bis 14 Stunden nach der Infektion. Dieser Zeitpunkt deutet auf den von anderen Autoren beschriebenen Wirkungsmechanismus hin, wonach der Inhibitor eine Wirkung auf die Strukturproteinbildung bei der Virusvermehrung haben soll. Zu den Reversionsversuchen läßt sich folgendes sagen:

Wenn nach 24stündiger Einwirkdauer die Substanz aus dem infizierten Röhrchen entfernt wurde, war wieder ein deutlicher CPE zu sehen. Auch die 3 Kapsidantigene, die nach 48stündiger Inkubation vollständig gehemmt worden waren, zeigten bei nur 24 Stunden Einwirkzeit von Cycloheximid abermals deutliche Titer. Die Ausschaltung des

für die Spätproteinbildung notwendigen Enzyms war also wohl vollständig, jedoch nach Entfernung der Substanz reversibel. Offenbar sind die für die Virusreplikation notwendigen Zellfunktionen nur gehemmt, aber nicht dauerhaft geschädigt worden.

2. Streptovitacin A

Strept. A, ein 4-Hydroxy-Derivat von Cycloheximid, wurde 1960 von SMITH u.a. (15) als Hemmstoff gegen Epidermoid-Carzinomzellen in vitro getestet. Mit 0,64 µg/ml wurde das Zellwachstum vollständig unterdrückt. In unseren Virushemmversuchen mit HeLa-Zellen war es in Konzentrationen zwischen 10 und 20 µg toxisch. Entsprechend den Ergebnissen von SMITH u.a. haben auch unsere Untersuchungen ergeben, daß die Zytotoxizität in den ersten 24 Stunden nach der Infektion relativ gering ist, daß sie danach jedoch beträchtlich zunimmt. Wie mit Cycloheximid wurden auch hier die Adenoviren bis 14 Stunden nach der Infektion vollständig gehemmt. Es wird sich also auch hier wohl um eine Wirkung der Substanz auf die Strukturprotein-Synthese handeln. Dabei liegt die minimale Hemmkonzentration von Strept. A wesentlich niedriger als bei Cycloheximid, nämlich bei 1 µg/ml. Die Reversionsversuche nach 24stündigem Einwirken der Substanz führten ebenfalls zu einem Wiederauftreten des CPE. Die Kapsidantigene von Adenovirus 19 verhielten sich in entsprechender Weise.

3. Fluorphenylalanin

Die inhibitorische Wirkung von FPA wurde von uns, wie schon erwähnt, nur in wenigen Versuchen zur Orientierung getestet. Wir fanden in den Konzentrationsversuchen weitgehende Übereinstimmung mit WILCOX u. GINSBERG (22). Wir erreichten mit 100 µg eine Hemmung der Bildung von infektiösem Virus und KB-Antigenen, aber auch von hämagglutinierenden Antigenen; letztere waren von WILCOX u. GINSBERG nicht bestimmt worden. Abweichend von den Ergebnissen der genannten Autoren trat bei unseren Versuchen ein deutlicher CPE auf. Möglicherweise spielt die dort gewählte höhere Konzentration (300 µg/ml) eine Rolle. Ein von uns durchgeführter Zeitversuch bewirkte eine vollständige Hemmung der Virusantigene bis einschließlich 12 h p i, während bei WILCOX u. GINSBERG die Antigenbildung bis 16 h p i unterdrückt wurde. Ob auch hier die höhere Konzentration von FPA ins Gewicht fällt, müßte eigens geprüft werden. Nach WILCOX u. GINSBERG greift der Inhibitor mit 2 Mechanismen in die Protein-Synthese ein: Einmal durch Hemmung von Enzymproteinen, die für die spätere Bildung von Virusstrukturprotein wichtig sind, zum anderen durch die Bildung von fehlerhaftem und damit für die Virussynthese nicht verwendbarem Virusstrukturprotein. In den Ausführungen von POLASA u. GREEN (14),die ihre Versuche an Adenovirus 2 in KB-Zellen durchführten, ist beschrieben, daß FPA mit einer niedrigen Konzentration von nur

8 µg/ml keine Wirkung auf die Früh- oder Enzymproteine zeigt. Die Synthese der Virusstrukturproteine soll jedoch bis 10 h p i vollständig gehemmt werden.

Aus unserer Virusvermehrungskurve können wir entnehmen, daß die Eklipse bei Adenovirus 19 unter den gewählten Versuchsbedingungen etwa 15 Stunden dauert. Bei POLASA u. GREEN dauerte sie für Adenovirus 2 in KB-Zellen 13 Stunden. Die Eklipse dauert also bei Adenovirus 19 2 Stunden länger. Es ist anzunehmen, daß damit auch die frühen Prozesse der Virusvermehrung bei Adeno 19 ca. 2 Std. länger dauern. Da in unseren Versuchen der Zeitpunkt der vollständigen Hemmung bei 12 Std. liegt, kommen wir mit unserem Ergebnis am nächsten an POLASA u. GREEN heran. Wir können eine Wirkung von FPA auf die Bildung der Virusstrukturproteine als wahrscheinlich annehmen.

4. Actinomycin D

fiel bei den Konzentrationsversuchen durch seine starke Zytotoxizität auf. Es zeigte nämlich bereits mit 0,2 µg/ml nach der üblichen Inkubationszeit von 48 Std. erheblich zerstörte z.T. abgelöste Zellen. Bei den Versuchen von KÖHLER u. ODAKA (12) mit KB-Zellen trat bei 0,05 µg/ml eine Hemmung der Zellvermehrung ein. In Zeitversuchen mit Adenovirus 2 verwendeten sie 4 µg Act. D, das in 2 Std.-Intervallen in die Kulturröhr-

chen gegeben wurde. Sie stellten fest, daß in den ersten 16 Std. nach der Infektion durch Act. D eine Hemmung der Virussynthese möglich ist. Auch die Bildung von Virusantigenen wurde unterdrückt. Durch weitere Versuche mit radioaktiv markierten KB-Zellen wurden die Basenverhältnisse von Wirtszelle und Virus während der Hemmungsphase genauer erforscht. Man fand, daß bei mit Act D behandelten infizierten Zellen keine m-RNS gebildet wird. Die Annahme lag nun nahe, daß Act D mit einer Base der Wirtszell-DNS reagiert und so die Synthese von m-RNS unmöglich macht. Aus der Verschiebund der Basenverhältnisse konnte Guanin als blockierte Base identifiziert werden. In unseren Zeitversuchen mit Act D zeigte sich bis zu 12 h p i eine Vermehrungshemmung aller Kapsidantigene. Auch der CPE war nicht mehr vorhanden. Eine Zugabe des Inhibitors 14 h p i konnte jedoch die Virushemmung nicht mehr vollständig hemmen.

Bei den Zeitversuchen mit Act D, Cycloheximid und Strept A ist folgender Unterschied konstant nachzuweisen: Act D hemmt vollständig nur, wenn es spätestens 12 h p i zugefügt wurde; die beiden anderen Inhibitoren der Protein-Synthese dagegen hemmen bis 14 h p i . Dies ist so zu interpretieren, daß die für die Synthese der Strukturproteine erforderliche m-RNS bis 12 h p i weitgehend und 16-18 h p i vollständig synthetisiert ist; die Synthese der Virusproteine, die

mit Cycloheximid u. Strept A gehemmt wird, erfolgt in etwa 2stündigem Abstand, d.h. von 14 h p i an beginnend.

5. Rifampicin

das bis dahin vorwiegend als Bakteriostatikum gegen Mycobakterium tuberculosis eingesetzt wurde und dort den Transkriptionsschritt in der Vermehrung hemmt, wurde 1969 von SUBAK-SHARPE u.a. (17) als Inhibitor für Pocken- und Adenoviren getestet. Betreffs Toxizität wurde in der Veröffentlichung angegeben, daß mit Konzentrationen von 100-150 µg/ml in KB-, BSC 1- und Mäuseembryozellkulturen gewisse degenerative Veränderungen auftraten. Es wurde weiter bemerkt, daß HeLa-Zellen etwas widerstandsfähiger seien. Die Autoren äußerten im übrigen die Vermutung, daß die Verunreinigung des Hemmstoffes für die Toxizität und sogar für die antivirale Wirkung von Bedeutung sein könnte. Unsere Toxizitätsprüfung für Rifampicin in HeLa-Zellen ergab mit 800 µg/ml innerhalb von 24 Std. eine zellschädigende Wirkung. In den Versuchen von Subak-Sharpe u.a. war eine Hemmung von Adenovirus 1 ebenfalls in HeLa-Kulturen durch 100 µg/ml Rifampicin möglich. Wir hatten Hemmerfolge nur mit höheren Konzentrationen von 400 µg/ml. Hierdurch wurde die Neubildung aller Kapsidantigene vollständig unterdrückt; dagegen fand sich keine Behinderung des CPE. Zeitversuche mit der Substanz an Adenoviren hatte die Subak-Sharpe-Gruppe

nicht beschrieben; lediglich Vaccinia wurde auf zeitliche Hemmung genauer untersucht. Aus unseren Zeitversuchen konnten wir entnehmen, daß bei Zugabe bis zu 10-12 h p i eine totale Hemmung erzielt werden kann. Jedoch auch 14-16 h p i war noch eine deutliche inhibitorische Wirkung zu verzeichnen, so daß der Zeitpunkt der Hemmung für Rifampicin nicht in einer frühen Phase der Virusreplikation zu suchen ist.

6. Cytosin-Arabinosid

C.G. SMITH (16) veröffentlichte im Jahre 1966 eine ausführliche Arbeit über die Substanz und berichtete von ihrer Hemmwirkung auf Herpes- und Vacciniavirus. Als Gewebekulturen dienten HeLa- und KB-Zellen. Zur Erreichung einer Hemmung von Herpesvirus waren 0,7 µg/ml Ara-C erforderlich, zur vollständigen Hemmung von Vacciniavirus benötigte er 2 µg/ml. FELDMANN u. RAPP (3) befaßten sich ebenfalls 1966 mit der Wirkung des Hemmstoffes auf Adenotyp 2, 7 und 12 in Kulturen von menschlichen embryonalen Nierenzellen, HeLa- und KB-Zellen. Die in den Versuchen verwendete Konzentration von 10 µg/ml zeigte keinerlei zytotoxische Erscheinungen. Auch in unseren Untersuchungen der Substanz auf Toxizität stellten wir fest, daß selbst mit 500 µg/ml keine Zellschädigung vorhanden war.

FELDMANN u. RAPP fanden bei einem Vergleich von mit Ara-C behandelten und unbehandelten Kulturen eine Hem-

mung der Virussynthese von 70-99 %. Mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik wurde an den genannten Virustypen gezeigt, daß lediglich die Synthese von Virusantigen durch Ara-C verhindert wird, nicht aber die von T-Antigen, das sich im Kern der infizierten Zelle ablagert. Als Zellkultur kamen in diesem Versuch embryonale Nierenzellen zur Anwendung; die Dosierung lag auch hier bei 10 µg/ml.

HOLLINSHEAD u. HUEBNER (11) kamen mit der gleichen Konzentration bei Adenovirus 12 in HeLa- und KB-Zellen ebenfalls zu dem Ergebnis, daß Ara-C die Bildung von V-Antigen hemmt, diejenige von T-Antigen dagegen nicht beeinflußt.

Im Gegensatz dazu erreichten GILDEN u.a. (8) in Versuchen mit den Adenotypen 7 und 12 in embryonalen Nierenzellen und KB-Zellen selbst bei 100 µg/ml der Substanz keine Verringerung der V-Antigen-Produktion.

Von diesen Ergebnissen der Gilden-Gruppe abweichend und in Übereinstimmung mit den vorher genannten Autoren erzielten wir bei Adenotyp 19 eine vollständige Hemmung in der Bildung der Kapsidantigene durch 1 µg/ml Ara-C. Jedoch lag in späteren Versuchen (WIGAND u. SCHMIEDER (20))die zur Virushemmung erforderliche Dosis wesentlich höher (bei 20 µg/ml). In Ermangelung geeigneter Seren konnten wir die Bildung von T-Antigen und seine Hemmung nicht untersuchen. Hinweise auf eine Hemmung

oder Nichthemmung des CPE gab es bei den erwähnten Autoren nicht. Wir fanden mit Ara-C im Gegensatz zu unseren Versuchen mit Inhibitoren der Proteinsynthese keine Beeinflussung des cytopathischen Effektes. Unsere Zeitversuche brachten eine vollständige Hemmung bis 10 h p i . Bei 12 h p i war nur noch eine inhibitorische Wirkung auf infektiöses Virus und hämagglutinierendes Antigen nachweisbar; die komplementbindenden Antigene blieben unbeeinflußt. In Anbetracht der Tatsache, daß die Hemmwirkung von Ara-C auf die DNS-Synthese als gesichert gilt, können wir aus unseren Zeitversuchen schließen, daß der Zeitpunkt der DNS-Synthese bei der Replikation von Adeno 19 bei 10 h p i zu suchen ist.

7. Jod-Desoxyuridin

Nach einer Tabelle von FURUSAWA u.a. (5), die 1964 neben anderen Substanzen mit antiviraler Wirkung IUdR in seiner Hemmwirkung auf verschiedene Viren testeten, lag die kleinste toxische Dosis in HeLa-Zellen bei 500 µg/ml. Als Vertreter der Adeno-Gruppe hatte man Adenovirus 12 ausgewählt, mit dem man die Zellen 3 Tage lang inkubieren mußte, um einen vollständigen CPE zu erhalten. Bei unserer Toxizitätsprüfung zeigte sich bis 1000 µg/ml keinerlei toxische Wirkung auf die Zellkulturen. In den Hemmversuchen verwendeten FURUSAWA und Mitarbeiter 0,8 µg/ml IUdR, womit angeblich eine gute Virushemmung zu erreichen war. Auch der CPE sei gehemmt worden. Wir

benötigten dagegen zu einer vollständigen Hemmung aller Kapsidantigene 50 µg/ml und fanden keine Beeinflussung des CPE.

NASZ u. KULCSAR (13) berichteten von der Wirkung einer 0,05 % IUdR-Lösung (= 500 µg/ml) auf Adenovirus 8 in Amnionzellkulturen des Menschen. Mit der genannten Konzentration konnten sie keine nennenswerten zytotoxischen Erscheinungen in der Gewebekultur beobachten. Der CPE sei verzögert gewesen und in manchen Versuchen habe IUdR eine hemmende Wirkung gezeigt.

HECHT u.a. (10) verzeichneten in 18 Fällen von epidemischer Keratokonjunktivitis, die durch Adenotyp 8 hervorgerufen wird, keine therapeutische Wirksamkeit. Auch KAUFMAN (zitiert nach HECHT), der die Herpeskeratitis mit IUdR erfolgreich behandelte, fand keine inhibitorische Wirkung auf die Keratokonjunktivitis durch Adenovirus 8. Die in den Versuchen zur Anwendung gekommene Konzentration wurde nicht angegeben. Bei HECHT u.a. wurde weiter vermerkt, daß sich auch dann kein Stopp der Virusvermehrung zeigte, wenn die Behandlung mit IUdR gleich zu Beginn des Hornhautbefalles durchgeführt wurde; vielmehr traten unter dem Therapieversuch sogar neue Cornealäsionen auf. TOMMILA u.a. (18), die über eine Krankenhausepidemie von Kerato-Konjunktivitis durch Adenotyp 7 berichteten, stellten ebenfalls keine therapeutische Wirksamkeit der Substanz fest. Die Patienten

erhielten 7 Tage lang alle 2 Stunden Augentropfen mit IUdR in einer Konzentration von 1000 µg/Ml. Von DE LAVERGNE u.a. (1) wurden Toxizitätsversuche mit der Substanz durchgeführt, die bis zu 300 µg/ml keine schädigende Wirkung auf Affennierenzellen, KB-Zellen und andere Kulturen ausübte. Die Adenovirustypen 1, 2, 3 und 9 zeigten mit 1000 µg/ml keine Hemmung; als Kriterium haben die französischen Autoren jedoch fast ausschließlich den CPE verwendet, was auf Grund unserer Befunde keine Aussage über die Inhibition erlaubt. In unseren Konzentrationsversuchen lag die vollständige Hemmung aller Kapsidantigene von Adenovirus 19 bei einer Dosierung mit 50 µg/ml. Mit IUdR-Konzentrationen von 40 µg/ml und weniger fiel uns eine reproduzierbare dissoziierte Wirkung auf die Kapsidantigene auf; d.h. die Kapsidantigene wurden nicht alle in gleicher Weise gehemmt. So beobachteten wir eine isolierte Hemmung der Infektiosität, während in der HA-Reaktion und in der KBR deutliche Antigentiter nachweisbar waren. Eine mögliche Erklärung für diese Erscheinung wäre der Einbau von IUdR in die neugebildete Virus-DNS anstelle von Thymidin. Es könnte möglich sein, daß die durch diese Substitution veränderte DNS zwar noch zur Bildung der hämagglutinierenden und komplementbindenden Antigene imstande ist, daß aber für die Bildung von infektiösem Virus eine unveränderte oder nur wenig substituierte Virus-DNS erforderlich ist. Aus unseren Versuchen läßt sich ersehen, daß in mittleren

Dosen von IUdR (50 µg) die Substitution groß genug ist, um die Bildung von infektiösem Virus selektiv zu hemmen.

Nach Beschreibung unserer Versuchsergebnisse, insbesondere unserer Zeitversuche, und nach deren Vergleich mit den Beobachtungen anderer Autoren, erhalten wir über den Vermehrungszyklus und den zeitlichen Ablauf der biochemischen Prozesse von Adenovirus 19 folgendes Bild: Die Adsorption und die Penetration des Virus in die Zelle dauert wie bei den meisten Adenoviren ca. 2 Std. Mit Hilfe von Ara-C und IUdR läßt sich der Beginn der Synthese der Virus-DNS zwischen 8 und 10 Std. post infectionem datieren. POLASA und GREEN (14) erforschten die biochemischen Vorgänge bei Adenotyp 2 mit FUdR und fanden hier das Einsetzen der DNS-Synthese ab 7 h p i . Über das Auftreten des CPE gab es bei den genannten Autoren keine Hinweise. An unseren HeLa-Zellen kommt es mit Adenotyp 19 ab 10-12 h p i zu den ersten cytopathischen Erscheinungen. Actinomycin D, dessen inhibitorische Wirkung auf die Bildung der m-RNS als sicher gilt, zeigt in unseren Versuchen eine Hemmwirkung erst ab 12 h p i . Cycloheximid und Streptovitacin A, die auf den Translationsschritt der Proteinsynthese einwirken, hemmen bis 14 h p i . Demnach beginnt hier die Bildung der Strukturproteine. Für Adenovirus 2 lag nach POLASA und GREEN (14) der Anfang der Strukturproteinsynthese bei 10 h p i . Da Rifampicin in unseren Versuchen 14 - 16 h p i deutliche Hemmerfolge zeigt, können wir

eine Wirkung auf die Virusreifung als wahrscheinlich annehmen. Nach Untersuchungen von GREEN an Adenovirus 2 (9) ist reifes Virus ab 13 Std. nach der Infektion intrazellulär nachweisbar.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die Wirkung von Inhibitoren der Protein- und DNS-Synthese auf die Vermehrung von Adeno-Virus 19 in HeLa-Zellkulturen untersucht. Die Virusvermehrung wurde mit Hilfe von mikroskopischen und serologischen Methoden bestimmt. Die Inhibitoren der Proteinsynthese Cycloheximid, Streptovitacin A, p-Fluorphenylalanin führten in geeigneter Konzentration zu einer vollständigen Hemmung des CPE, sowie der Synthese von infektiösem Virus und Kapsidantigenen. Ebenso verhielt sich Actinomycin D, das auf die DNS-abhängige RNS-Synthese einwirkt. Die Inhibitoren der DNS-Synthese Cytosin-Arabinosid und 5-Jod-2Desoxyuridin bewirkten zwar eine vollständige Hemmung der Synthese von infektiösem Virus und Kapsidantigenen, der CPE blieb jedoch unter ihrer Einwirkung unbeeinflußt. Mit mittleren Dosen von IUdR zeigte sich lediglich eine Hemmung der Bildung von infektiösem Virus. Rifampicin zeigte das gleiche Verhalten wie die untersuchten Inhibitoren der DNS-Synthese, läßt sich jedoch wegen seines anderen Wirkungsmechanismus nicht den genannten Inhibitorgruppen zuordnen.

Im Rahmen der Zeitversuche mit Inhibitoren der Proteinsynthese,wie Cycloheximid und Streptovitacin A,war eine gute Hemmwirkung bis 14 h p i möglich. p-Fluorphenylalanin und Actinomycin D hemmten bis 12 h p i vollständig. Von den Inhibitoren der DNS-Synthese brachte Ara C eine Hem-

mung aller Kapsidantigene bis 10 h p i, IUdR hingegen bis 12 h p i. Die zeitliche Hemmwirkung von Rifampicin lag zwischen 10 und 12 h p i.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. DE LAVERGNE,E.,OLIVE,D., GEORGES,I.C. and LE MOYNE,M.T. — Action de IUdR sur quelques virus à ADN en cultures cellulaires. Revue d'immunolog. 29, 241-266 (1965).

2. FALKE,D. and RADA,B. — 6-Azauridine as an inhibitor of the synthesis of Herpesvirus hominis. Acta virol. 14, 115-123 (1970).

3. FELDMAN,L.A. and RAPP,F. — Inhibition of Adenovirus replication by 1-ß-D-arabinofuranosylcytosine. Proc. Soc. exp. Biol. 122, 243-247(1966).

4. FORD,J.H. and LEACH,B.E. — Actidione, an Antibiotic from Streptomyces Griseus. J. Am. Chem. Soc. 70, 1223-1225 (March 1948).

5. FURUSAWA,E.,CUTTING,W. and FURST,A. — Inhibitory effect of antiviral compounds on Columbia SK, LMC, vaccinia and adenoviruses in vitro. Chemotherapia 8, 95-105 (1964).

6. GELDERBLOM,H.,BAUER,H., FRANK,H. and WIGAND,R. — The structure of group II adenovirus. J.gen.Virol. 1, 553-560 (1967).

7. GELDERBLOM,H.,MEISER,W., LENGYEL,A. and WIGAND,R. — The serological relationship of the soluble antigens of adenovirus type 19. J. gen. Virol. 2, 331-340 (1968).

8. GILDEN,R.V.,KERN.J., LEE,Y.K. and HUEBNER,R.J. — Biological separation of Adenovirus T and V antigen synthesis in KB cells. Proc. soc. exp. Biol. 127, 639-642 (1968).

9. GREEN,M. — Studies on the biosynthesis of viral DNA. Cold Spring Harbor Symp. 27, 219-235 (1962).

10. HECHT,S.D.,HANNA,L., SERY,T.W. and JAWETZ,E. — Treatment of epidemic keratoconjunctivitis with IUdR Arch. Ophth. 73, 49-54 (1965).

11. HOLLINSHEAD,A.C. and HUEBNER,R.J. — Adenovirus 12 virions-free 'T' antigen from infected cells inhibited with Cytosine arabinoside. Nature 210, 1381-1383 (1966).

12. KÖHLER,K. and ODAKA,T. — Zeitpunkt der Synthese und Zusammensetzung der m-RNS bei KB-Zellen nach Adenovirus-Infektion. Zeitschr. f. Naturforsch. 19B, 331-336 (1964).

13. NASZ,J. and KULCSAR,G. — Über die Wirkung von IUdR auf Adenovirus 8. zit. nach Zbl. Bakt. (Ref.) 199, 60 (1965).

14. POLASA,H. and GREEN,M. — Biochemical studies on adenovirus multiplication. VIII Analysis of protein synthesis. Vir. 25, 68-79 (1965).

15. SMITH,CH,G.,LUMMIS,W.L. and GRADY,J.E. — Studies on the mode of action of Streptovitacin A. Cancer research (1960).

16. SMITH,CH.G. — Biochemical and biological studies with Arabino-furanosyl-cytosine. Proc. of the 3rd Internat. Pharmaco logical Meeting (1966/68).

17. SUBAK-SHARPE,I.H., TIMBURY,M.C. and WILLIAMS — Rifampicin inhibits the growth of some mammalian viruses. Nature 222, 341-345 (1969).

18. TOMMILA,V. and LAPINLEIMU,K. — A hospital epidemic of keratoconjunctivitis caused by Adenovirus type 7 in Helsinki. Acta Ophth. 43, 294-298 (1965).

19. WIGAND,R. — Erfahrungen mit der Mikromethode der Komplementbindungsreaktion. Z. Hyg. Infekt-Kr. 143, 188-214, (1956).

20. WIGAND,R. und SCHMIEDER, U.J. — Inhibition of Adenovirus Multiplication by Metabolic Inhibitors. (1973) (in Vorbereitung).

21. WIGAND,R. and WUNN,W. Die Vermehrung von Adenoviren der Gruppe II in HeLa-Zellen. Arch. f. die gesamte Virusforschg. 21, Heft 1 (1967).

22. WILCOX,W.C. and GINSBERG,H.S. Protein synthesis in type 5 adenovirus-infected cells. Effect of PFPA on the synthesis of protein, nucleic acids and infectious virus. Vir. 20, 269-80 (1963).

Ursula Josefa Schmieder
6653 Blieskastel
Klosterweg 1

L E B E N S L A U F

Am 19. März 1945 wurde ich in Dijon/Frankreich als Tochter des Kaufmanns Theodor Matz und seiner Ehefrau Maria geb. Klein geboren.

Von 1951 bis 1956 besuchte ich die Volksschule in Blieskastel. Danach war ich Schülerin des Realprogymnasiums und anschließend des Staatlichen Aufbaugymnasiums in Blieskastel. 1965 legte ich dort die Reifeprüfung ab. Vom Sommersemester 1965 an studierte ich Medizin an der Universität des Saarlandes. Die naturwissenschaftliche Vorprüfung bestand ich am 11. April 1967, die Ärztliche Vorprüfung am 24. Okt. 1968, die Ärztliche Prüfung am 29. Nov. 1971 an der Universität des Saarlandes.

Herrn Professor Dr.med. R. WIGAND danke ich für die Überlassung des Themas sowie für Beratung und Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

Mein Dank gilt weiter Frau I. Maurer für die Bereitstellung der Gewebekulturen und Virusvorräte.